

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

В местах естественного обитания, включая организм хозяина, бактериальные популяции редко находятся в благоприятных условиях, испытывая при этом разнообразные стрессорные воздействия. Это способствует формированию покоящихся форм клеток, характеризующихся замедленной скоростью метаболизма и, как следствие, развитием толерантности к антибиотикам, нацеленным на процессы пролиферации. В формировании состояния покоя у различных видов микроорганизмов принимает участие широкая сеть адаптивных механизмов. Известно, что возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) является одним из наиболее развитых в этом отношении видом, что делает его ответственным за формирование латентной формы туберкулеза (ТБ) и способствует широкому распространению в популяции людей.

Исходя из этого, представленная диссертационная работа, посвященная изучению биохимических особенностей покоящихся форм (ПФ) микобактерий, является актуальной. Трудности изучения покоящихся персистирующих форм *Mtb* связаны с решением множества проблем, одной из которых является отбор наиболее адекватных моделей перехода микобактерий в состояние длительного покоя *in vitro*, близких к ситуации, характерной для носительства *in vivo*. В связи с этим, значительная часть работы посвящена разработке новых подходов к изучению биохимических особенностей процессов перехода микобактерий в покой и выхода из него, которые впоследствии могут быть использованы для поиска новых эффективных решений проблемы латентного ТБ. Этому во многом будут способствовать данные диссертационной работы, посвященные изучению факторов, обеспечивающих сохранение жизнеспособности покоящихся микобактерий в условиях длительного отсутствия деления, а также механизмов, лежащих в основе их реактивации.

Большое значение для изучения развития толерантности микобактерий в отношении лекарственной терапии имеет предложенная автором диссертации концепция глубины состояния покоя микобактерий, которая впоследствии получила свое развитие в работах других авторов, рассматривающих степень глубины дормантности как фактор усиления персистентности, крайним состоянием которой является формирование некультивируемости (Pu et al., 2019).

Существенным достижением работы, наряду с описанием изменения протеомного профиля и ферментативной активности основных метаболических путей микобактерий при переходе в состояние покоя, имеет выявление факторов, обеспечивающих выход из него, в частности, роли аденилатциклаз в процессе реактивации, которые ранее упоминались как ключевые регуляторы VBNC состояния клеток *Escherichia coli* (Nosho et al., 2018).

Значительным достижением работы является описание противоположных по направленности эффектов нитрофенилтиоцианатов и трегалозы в регуляции механизмов некультивируемого состояния.

На основании данных о подкислении среды внутренних вакуолей макрофагов, зараженных микобактериями, автором диссертации разработана модель для формирования некультивируемых форм микобактерий в условиях закисления и

дальнейшего длительного выдерживания их в микроаэрофильных условиях, что способствовало формированию морфологически измененных покоящихся клеток характерной овоидной формы.

Исходя из этого, хотелось бы услышать мнение автора о возможности формирования поверхностных биопленок при длительном выдерживании микобактерий в микроаэрофильных условиях, а формируемые биопленочные сообщества – как возможный дополнительный источник покоящихся форм.

Описанные морфологические изменения, наблюдаемые автором с использованием различных видов микроскопических исследований, сопровождались заметным изменением типа метаболизма с характерным снижением внутриклеточного уровня АТФ и цАМФ. Сходные изменения энергетического метаболизма наблюдались также в клетках *E. coli* (Pu et al., 2019) и сопровождались формированием в них белковых агрегатов, располагающихся по полюсам клетки и рассматриваемых авторами в качестве индикатора глубины дормантного состояния.

В связи с этим, хотелось бы узнать, не наблюдались ли подобные включения в микобактериальных клетках?

Результаты диссертационной работы указывают на существенное накопление трегалозы в процессе перехода бактерий в состояние покоя. Хотя в протеоме покоящихся клеток были обнаружены ферменты синтеза трегалозы, синтез дисахарида требует затраты энергии, в частности, АТФ, количество которого в покоящихся клетках минимально.

Исходя из этого, хотелось бы узнать мнение автора о возможности альтернативных путей, ведущих к накоплению дисахарида, например, за счет расщепления трегалозодимиколата (ТДМ), основного гликолипида микомембраны, который расщепляется ТДМ гидролазой в ответ на голодание и стресс (Holmes et al., 2019; Ojha et al., 2010). Кроме того, мог бы данный эффект иметь отношение к наблюдаемым изменениям морфологических свойств покоящихся форм микобактерий (овоидные формы)?

В работе также подробно изучена роль факторов, участвующих в реактивации покоящихся микобактерий Rpf и Rip, факторов реактивации липидной природы, пептидогликана, аденилациклазы и других. На основании анализа данного материала предложена гипотетическая схема реактивации покоящихся микобактерий, в которой лаконично описана поэтапная цепь событий, ведущая в конечном итоге к активации ряда процессов, приводящих к стимуляции клеточного деления.

В заключение дается тезисное изложение основных положений и выводов диссертации, убеждающих в достоверности выявления новых механизмов образования покоящихся микобактерий, а также их реактивации, что важно как для фундаментальной так и медицинской микробиологии. Автореферат диссертации в полной мере отражает содержание проделанной работы.

Особого внимания заслуживает тот факт, что достоверность и новизна полученных автором результатов обеспечена оригинальностью и многообразием экспериментальных подходов на основе использования новейших методических разработок.

По теме диссертационной работы опубликовано 20 работ, большинство из которых - в журналах с высоким импакт-фактором. Результаты исследования были доложены на конференциях международного уровня.

Диссертационная работа Шлеевой Маргариты Олеговны по своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов соответствует положениям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (Ред. от 01.10.2018 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов
Института экологии и генетики микроорганизмов Пермского
федерального исследовательского центра Уральского отделения
Российской академии наук,
доктор мед. наук по специальностям
03.01.04 Биохимия, 03.02.03 Микробиология,
профессор

Ткаченко Александр Георгиевич

Почтовый адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии Наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки

Контактный телефон: 8(342) 2122159

Адрес электронной почты: agtkachenko@iegm.ru

*Подпись Ткаченко А.Г. удостоверяю:
Врио директора ИЭГМ ПФИЦ УрО РАН,
доктор мед. наук, профессор*



С.В. Гейн